



---

# APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE ADN AMBIENTAL EN CIENCIAS AMBIENTALES

---

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES  
FACULTAD DE CIENCIAS EL MAR Y CIENCIAS AMBIENTALES  
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ



AUTOR: AMADOR HUERTA VELA  
TUTOR: ALEJANDRO CENTENO-CUADROS  
CURSO: 2019/2020



## **INDICE**

1. Resumen y Abstract
2. Introducción
3. Objetivos
4. ADN ambiental
  - 4.1. Técnica y aspectos metodológicos
    - 4.1.1. Muestreo
    - 4.1.2 Conservación del material
      - 4.1.2.1. Tiempo
      - 4.1.2.2. Temperatura
    - 4.1.3 Análisis de las muestras
  - 4.2. ADN ambiental en la era de la genómica
  - 4.3. Aplicaciones del ADN ambiental en Ciencias Ambientales
    - 4.3.1. Ecosistemas antiguos
    - 4.3.2. Interacción planta-polinizador
    - 4.3.3. Análisis de la dieta
    - 4.3.4. Detección de especies invasoras
    - 4.3.5. Respuesta a la contaminación
    - 4.3.6. Análisis de la calidad del aire
    - 4.3.7. Inconvenientes comunes para las aplicaciones.
5. Bibliometría
6. Perspectivas de futuro
7. Conclusiones
8. Bibliografía

## **1. RESUMEN Y ABSTRACT**

### **Resumen**

El ADN ambiental (eDNA) es una técnica que analiza el material genético liberado por individuos que han transitado o habitan en el medio muestreado con el objetivo de identificar las especies a las que pertenece dicho material. El tipo de muestreo es no invasivo y permite analizar varios taxones simultáneamente partiendo de una misma muestra. Esta técnica, por lo general, identifica un mayor número de taxones y con menores tasas de error que las técnicas no moleculares. Desde la aparición de los secuenciadores masivos, el número de estudios relacionados con el eDNA ha aumentado exponencialmente debido a la relativa facilidad y abaratamiento de los costes asociados a la secuenciación. Las aplicaciones del eDNA siguen en aumento y se diversifican a través de diversas áreas de conocimiento asociadas a las Ciencias de la Vida, siendo hasta la fecha desconocido el impacto que ha tenido en cada una de ellas. Este trabajo cuantifica y describe la influencia que ha tenido el eDNA en las distintas competencias dentro del grado de Ciencias Ambientales. Las aplicaciones se han dividido en seis grupos principales (el estudio de ecosistemas antiguos, las interacciones planta-polinizador, el análisis de las dietas, la detección de especies invasoras, las respuestas a la contaminación o el análisis de la calidad del aire) que se describen y ejemplifican con trabajos publicados hasta 2019.

### **Abstract**

Environmental DNA (eDNA) is a technique that analyses the genetic material released by individuals within the sampled environment to identify the species. It is a non-invasive sampling that allows the analysis of several taxa simultaneously using the same sample. This technique identifies a greater number of taxa with fewer mistakes than non-molecular techniques. Once Next Generation Sequencers are widely distributed, the number of studies related with eDNA has experienced an exponential increased mainly due to the relative simplicity of the technique and the decrease of sequencing costs. The applications of eDNA continue increasing and diversifying through various fields of knowledge within Life Sciences. The impact caused to each of them is unknown or unmeasured. This work quantifies and describes the influence of eDNA over the different competences in the Environmental Sciences Degree. These applications have been divided into six main groups (study of ancient ecosystems,

interactions plant-pollinator, analyses of diets, detection of invasive species, responses to pollution or the analysis of air quality) and examples are provided.

## **2. INTRODUCCIÓN**

El ser humano ha tratado siempre de entender el movimiento de los organismos en la naturaleza para poder antecederse a ellos y mejorar la gestión de los recursos naturales. Hoy día, además, dicha gestión debe de ir estrechamente ligada a la conservación de la biodiversidad. El estudio de la biodiversidad y el movimiento de los organismos se ha realizado tradicionalmente mediante muestreos en el campo. En ellos se captura y marca a los individuos para posteriormente liberarles con el objetivo de recapturarlos e identificarlos en base a su marcaje. Esta metodología ha contribuido notablemente a la Ecología del Movimiento (Nathan et al., 2008), pues la comparación entre las localidades de captura y posteriores recapturas identifica los movimientos de los individuos. Sin embargo, las tasas de captura y proporción de individuos capturados en relación al total de la población utilizando este tipo de muestreos no siempre es suficiente para realizar estudios demográficos, especialmente en especies esquivas (Piaggio et al., 2014) o por problemas metodológicos (Meyer & Paulay, 2005)). El radiomarcaje, por otro lado, si bien describe con detalle los movimientos de los individuos, puede amenazar la supervivencia de las especies (e.g. Theuerkauf, Rouys, & Chatreau, 2007) por la propia captura y manejo de los individuos.

La aplicación de las técnicas genéticas al estudio de la biodiversidad ha contribuido notablemente al estudio de la fauna y flora silvestres. La caracterización y cuantificación de la biodiversidad vivió un fuerte impulso desde la creación del proyecto *Barcoding of life* (Hebert, Cywinska, Ball, & DeWaard, 2003) y el consorcio internacional *The Consortium for the Barcode of Life* (CBOL). Este proyecto plantea como objetivo identificar toda la biodiversidad mediante el uso de pequeñas secuencias de ADN estandarizadas, utilizando el CBOL como red logística. Desde entonces se han unido más de 200 organizaciones de 50 países diferentes al CBOL e impulsó *The Barcode of Life Data System* (BOLD) para ayudar a la adquisición, almacenamiento, análisis y publicación de todos los datos moleculares enmarcados dentro del CBOL (los llamados “códigos de barras”) (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Entrando en la segunda década del siglo XXI y gracias a los proyectos CBOL y BOLD hay información molecular disponible para identificar a cientos de miles de taxones. La verdadera dificultad hoy día se encuentra en nuestra capacidad de identificar cualquier traza de material genético que se encuentre en una muestra de tierra, agua o aire. Tal es la potencial aplicación de estas técnicas de muestreo (en el campo y en el laboratorio) que se acuñó el término “ADN ambiental” (*environmental DNA* o eDNA) para resumir al conjunto de técnicas de muestreo genético que permitan identificar a los organismos que estén o hayan estado en contacto con la muestra a analizar. Tal es el impacto que existe ya una revista especializada en este tipo de metodologías [*Environmental DNA*, editorial Wiley (<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/26374943>)]. Las técnicas de eDNA permiten identificar y monitorizar la biodiversidad presente en una muestra cogida en el medio ambiente, permitiendo ahora con mayor probabilidad y eficiencia trabajar con especies poco abundantes, esquivas y/o en peligro de extinción (Bohmann et al., 2014). Debido a su relevancia y aplicabilidad, así como al amplio abanico de áreas de conocimiento donde se utiliza el eDNA, este trabajo se centra en resumir las metodologías, aplicaciones y perspectivas de futuro del eDNA en las diferentes áreas donde las Ciencias Ambientales tienen competencias.

### **3. OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo de fin de grado es la recopilación y síntesis de información sobre eDNA para evaluar la extensión de su aplicación en distintas disciplinas de las ciencias de la vida dentro de las competencias del grado de Ciencias Ambientales.

Este objetivo general se alcanza abordando los siguientes objetivos específicos:

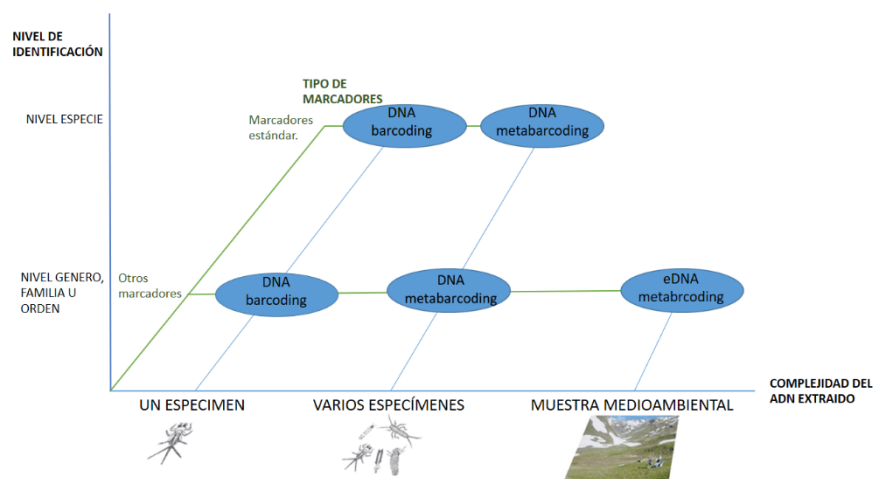
1. Describir la técnica del eDNA enfatizando en aspectos técnicos y metodológicos.
2. Describir las principales aplicaciones del ADN ambiental.
3. Cuantificar la aplicación del eDNA en distintas áreas de conocimiento relacionadas al grado de Ciencias Ambientales utilizando análisis bibliométrico.

#### **4) ADN AMBIENTAL:**

##### **4.1 TÉCNICA Y ASPECTOS METODOLÓGICOS.**

El ADN ambiental es una técnica para la obtención de material genético proveniente del medio (ya sea suelo, agua o aire) para el estudio de las especies o poblaciones que habitan o han habitado en él (Ruppert, Kline, & Rahman, 2019; Taberlet, Coissac, Hajibabaei, & Rieseberg, 2012). El término comenzó a utilizarse a principios de siglo a raíz de unas publicaciones en el área de Microbiología centradas en genómica de microorganismos no cultivados (Handelsman, 2004) y en la clonación del metagenoma del suelo (Rondon et al., 2000). Desde entonces el número de trabajos publicados que utilizan esta técnica ha aumentado exponencialmente (ver “Bibliometría”) y siguen surgiendo nuevas aplicaciones.

Las técnicas de eDNA se encuentran estrechamente relacionadas con las metodologías para la identificación de especies mediante marcadores moleculares. Estas últimas pueden clasificarse en función de si se identifica una o varias especies simultáneamente (*barcoding* y *metabarcoding*, respectivamente) y el marcador molecular a utilizar dependerá del nivel taxonómico al que se quiera llegar en la identificación (*Figura 1*).



*Figura 1.* Terminología sugerida para la identificación taxonómica en función de los marcadores moleculares utilizados, el nivel de identificación y la complejidad del ADN extraído. Figura modificada a partir de Taberlet et al., (2012).

Por tanto, el término *eDNA metabarcoding* se utiliza para el conjunto de técnicas moleculares que se usan para analizar muestras medioambientales en las cuales se

tiende a identificar varios especímenes simultáneamente pero cuya identificación suele llegar hasta niveles taxonómicos de género. Para tal fin se utilizan marcadores específicos (marcadores diseñados para un sistema de estudio determinado) ya que los considerados como genéricos (generalmente analizados y propuestos por el CBOL) suelen tener menor éxito de amplificación y, por tanto, plantean problemas técnicos en la secuenciación del material genético (Taberlet et al., 2012).

La metodología estandarizada para un estudio de eDNA se divide en cinco pasos clave (Figura 2):



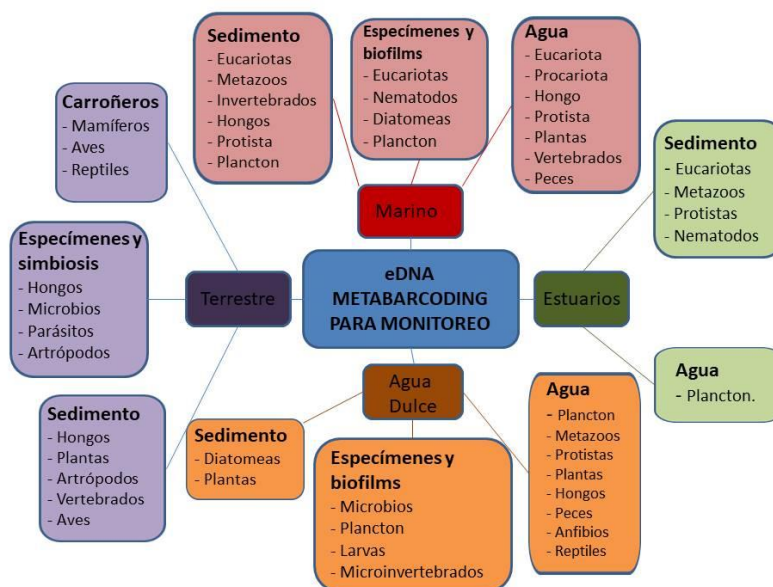
Figura 2. Metodología para ADN ambiental. Modificación a partir de <https://www.cegacanada.com/about.html>

La probabilidad de éxito del eDNA (entendida como la identificación de los especímenes presentes en la muestra original) aumentará siempre que se minimice la degradación del ADN desde la recolección de las muestras hasta el análisis de las mismas en el laboratorio. A continuación, se describen los aspectos clave en la conservación del ADN y sintetizan las metodologías vigentes y más utilizadas para esta técnica.

#### 4.1.1. Muestreo.

Las muestras se obtienen directamente del medio, sin necesidad de observarse a primera vista material biológico. Pueden recolectarse de cualquier medio (suelo, agua o aire) debido a la premisa de que todos los organismos se desprenden en algún momento de material genético a través de células epiteliales, excreciones, pelo, etc. Por ejemplo se puede obtener el ADN localizado en muestras de suelo o agua y tener éxito en la extracción del ADN de los organismos de interés siempre y cuando estas contengan restos biológicos de los mismos tales como orina (Valiere & Taberlet, 2000), heces (Kurose, Masuda, & Tatara, 2005), piel o cabello (Henry & Russello, 2011), hojarasca o los exudados de las raíces (Yoccoz et al., 2012). La principal diferencia con los muestreos no invasivos (aquellos en los que no se interacciona directamente en la especie a analizar para recolectar la muestra) (Taberlet & Luikart, 1999) es que en el eDNA existe la incertidumbre sobre si existe material genético o no en la muestra recogida.

El desarrollo de las metodologías de muestreo destinadas a la extracción de ADN para el eDNA ha sido tal que a día de hoy existe un amplio espectro de sustratos así como de taxones sobre los que se aplica la técnica. La *Figura 3* recoge los grupos taxonómicos que se han muestreado en diferentes sustratos a través de *eDNA metabarcoding*:



*Figura 3.* Monitorización de la biodiversidad a través de *eDNA metabarcoding*. Figura modificada a partir de Ruppert et al., (2019)



#### 4.1.2 Conservación del material.

Existe una gran importancia en la conservación que haya tenido el material biológico (y, por tanto, el material genético) desde su liberación en el medio hasta que se recoge la muestra. Todo material orgánico se degrada paulatinamente, pero dependiendo de las condiciones de almacenamiento esta degradación será mayor o menor. Los parámetros que mayor repercusión tienen en la conservación del ADN son el tiempo y la temperatura a la que se conserva el material.

Siempre que sea posible se utilizará criocongelación como método de conservación para obtener los resultados más fiables posibles. En caso de no poder utilizar dicha técnica por la zona de muestreo se recomienda utilizar un tampón NAP (*Nucleic Acid Preservation*) ya que es económico, fácil de transportar y no inflamable. Es posible recuperar ADN en alto peso molecular y ARN de calidad media tras meses de conservación a temperatura ambiente (Camacho-Sanchez, Burraco, Gomez-Mestre, & Leonard, 2013).

##### 4.1.2.1. Tiempo

Existen dos etapas clave para la conservación de las muestras. El tiempo que transcurre desde que se libera la muestra al medio hasta que es recolectada (primera etapa) varía según las condiciones físico-químicas del medio. Así por ejemplo, en aguas templadas las muestras pueden conservar el ADN durante semanas, frente a los miles de años en permafrost seco y frío (Thomsen & Willerslev, 2015). Debido a esto último, la técnica se ha utilizado en varias ocasiones para analizar diferentes grupos taxonómicos de ADN antiguo, logrando obtener material genético (Thomsen et al., 2009). La conservación y transporte de las muestras una vez colectadas (segunda etapa) cobran especial importancia para la aplicación de las técnicas de eDNA, ya que la cantidad y calidad del material genético en las muestras colectadas (dependiendo del sustrato) suele ser menor que el disponible en el material biológico colectado directamente de los individuos. Un método de conservación no apropiado para el tipo de muestra a analizar, por tanto, puede causar una pérdida importante del ADN molde para seguir adelante con el muestreo genético. Las muestras obtenidas se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo conforme menor sea la temperatura de conservación de las muestras, obteniendo como resultado un banco de muestras al que acceder cuando se quiera para volver a analizarlo (Lear et al., 2018).

#### 4.1.2.2. Temperatura

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, se puede recomendar la preparación para su almacenamiento en congeladores desde el momento en que las mismas sean colectadas. El protocolo de almacenamiento generalmente propuesto consiste en almacenar las muestras inmediatamente a 4°C y trasladarse a congeladores (-20°C) antes de haber pasado 48 horas (si se van a analizar a corto plazo) o a -80°C para ser analizado a largo plazo (Lear et al., 2018). Se ha demostrado recientemente que las muestras de agua se podrían conservar a temperatura ambiente hasta 14 días antes de la degradación del ADN que impida su extracción y caracterización (Wegleitner, Jerde, Tucker, Chadderton, & Mahon, 2015). Del mismo modo, el análisis de la conservación de muestras de ADN ambiental en estudios de microbiomas ha revelado que no hay una mejora significativa de la conservación dentro de los primeros 14 días desde el muestreo al utilizar -20°C y -80°C (Lauber, Zhou, Gordon, Knight, & Fierer, 2010).

Existen dos protocolos para envíos que no tarden más de tres días de muestras que se vayan analizar en otro laboratorio. Por un lado, si las muestras se congelaron o liofilizaron se deben mantener en los congeladores a -20°C con el hielo seco que se utilizará para enviar hasta su destino. Por otro lado, las muestras conservadas en etanol al 75% se pueden mantener a temperatura ambiente (Straube & Juen, 2013). Sin embargo, para determinados tipos de muestras (e.g. heces o determinados tipos de agua) (Spens et al., 2017) se recomienda no realizar la extracción de ADN nada más recolectarlas, sino almacenarlas por diferentes métodos de enfriamiento, secado (Nsubuga et al., 2004) (ver Hartb, Bainarda, & Klironomosb (2010) como excepción para ADN fúngico), liofilización o adición de conservantes para posteriores análisis (Lear et al., 2018).

#### 4.1.3 Análisis de las muestras

En función de la naturaleza de la muestra puede ser necesario realizar un preprocesamiento antes de la extracción del ADN para mejorar la calidad de secuenciación (Wittwer et al., 2018). Lear y colaboradores recomiendan para estos preprocesamientos el uso de kits Qiagen DNeasy PowerSoil y PowerMax para la extracción de ADN de suelo, sedimento, heces y hojarascas, DNeasy PowerSoil para la extracción de ADN del tejido vegetal, DNeasy Blood y Tissue para la extracción en

tejido animal en general y DNeasy PowerSoil para macroorganismos de agua y hielo (Lear et al., 2018).

Los estudios de eDNA pueden centrarse en una o varias especies (*Figura 1*), para lo cual se utilizan cebadores específicos o genéricos, respectivamente (Thomsen & Willerslev, 2015). El marcador genérico postulado por el CBOL y más utilizado para metazoos consiste en el gen de la citocromo oxidasa-I (*COI*) mientras que para las plantas se utiliza un fragmento de la cadena grande del enzima de la ribulosa bifosfato carboxilasa (*rcbL*).

Los cebadores utilizados deben de tener una longitud en pares de bases lo suficientemente corta para poder unirse a fragmentos degradados de ADN que idealmente sean idénticas pero variables entre especies (Epp et al., 2012). Para los trabajos de *eDNA metabarcoding*, por tanto, se recomienda i) multiplexar los cebadores (es decir, combinar varias parejas de cebadores en una misma reacción), ii) que los organismos que se intente identificar sean recíprocamente monofiléticos y, en la medida de lo posible, iii) que coincidan con las bases de datos existentes para los grupos taxonómicos que se quieran estudiar (Drummond et al., 2015).

## **4.2 ADN AMBIENTAL EN LA ERA DE LA GENÓMICA**

La secuenciación automática de ADN fue introducida en 1977 (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977) y permitía obtener 1000 pares de bases (1000 pb = 1 kb) de información de la secuencia de una muestra determinada. Esta técnica revolucionó el área de genética en todas las disciplinas de Ciencias de la Vida, llegando a ser la principal técnica de secuenciación para el proyecto genoma humano (Venter et al., 2001). El avance de las tecnologías de secuenciación automática junto a la creciente necesidad de secuenciación masiva que minimice los tiempos y costes promovió el desarrollo de la denominada secuenciación masiva (*New Generation Sequencing*, NGS) (Taberlet et al., 2012). Las técnicas NGS son un conjunto de técnicas de secuenciación genética de alto rendimiento que permiten secuenciar de forma rápida secuencias largas (Mb) del genoma y en paralelo (es decir, varias muestras simultáneamente). Con NGS se obtienen decenas de miles de pares de bases reduciendo a unas cuantas horas el tiempo que hasta hace pocos años requeriría meses de trabajo (Shokralla, Spall, Gibson, & Hajibabaei, 2012). Por tanto, NGS ofrece un salto cualitativo y cuantitativo del

rendimiento adquirido con las técnicas de secuenciación de Sanger. La *Tabla 1* muestra una comparativa entre ambas técnicas de secuenciación.

	<b>SANGER</b>	<b>NGS</b>
<b>Estrategia</b>	Reacciones separadas para los distintos exones de un solo gen	Una reacción para el análisis simultáneo de varios genes
<b>Muestras</b>	Clones, ampliaciones de PCR	Librerías de ADN, genoma completo
<b>Longitud de la lectura</b>	Kb	Gb
<b>Datos</b>	Una lectura / Una muestra	Miles o millones de lecturas / Una muestra
<b>Resolución</b>	Muchas moléculas en la misma lectura	Una molécula por lectura
<b>Ventaja</b>	Elevada precisión	Buena relación costo/beneficio, análisis simultáneo
<b>Desventaja</b>	Precio y consumo de tiempo	Análisis de gran cantidad de datos

*Tabla 1.* Comparativa entre la secuenciación Sanger y masiva (NGS)

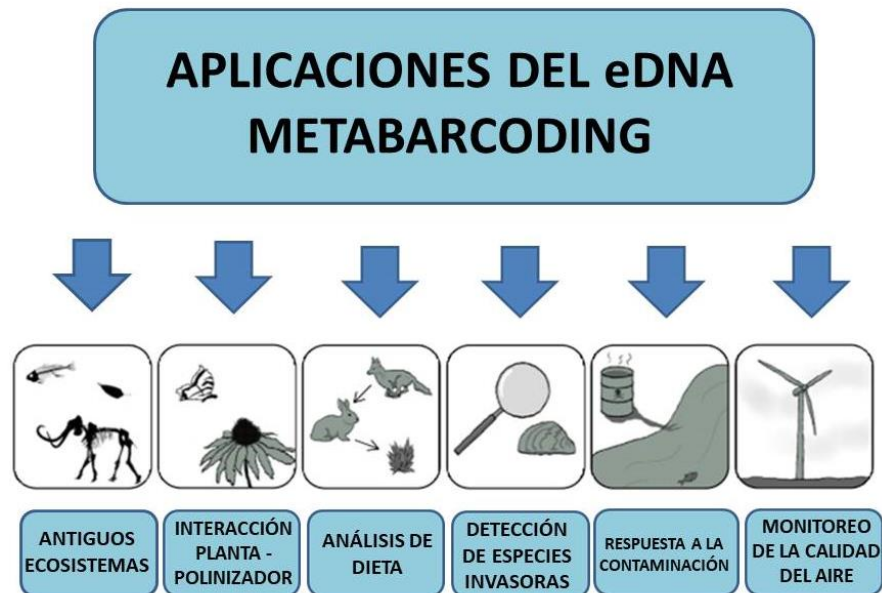
Los secuenciadores NGS redujeron el tiempo empleado y aumentaron la longitud de los fragmentos secuenciados, todo ello a costes más reducidos (pasando de 10\$ por nucleótido en 1990 utilizando secuenciación automática de Sanger a 0,01\$ utilizando secuenciación NGS en 2005), aumentando de este modo el rendimiento. En la actualidad, existen tres plataformas de secuenciación masiva que son las más utilizadas (*Anexo 1*).

#### **4.3. APLICACIONES DEL ADN AMBIENTAL EN CIENCIAS AMBIENTALES**

El número de estudios relacionados con el ADN ambiental creció de manera exponencial a partir de 2012, fundamentalmente por el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva y la competencia en el mercado de las distintas plataformas de secuenciación. Una consecuencia directa fue el aumento casi exponencial (ver apartado 5 “Bibliometría”) del número de aplicaciones de esta técnica a diversas disciplinas dentro de las Ciencias de la Vida. Todas tienen en común la misma finalidad (identificar especies) y las difiere el contexto y aplicación de la metodología. Por ejemplo, una muestra de excremento se puede utilizar para identificar la dieta del animal que la defecó (análisis de dieta) o para identificar al propio animal que la defecó. En este último caso, identificar a las especies puede servir para contribuir a la conservación de unas (Qu & Stewart, 2019) o, por el contrario, para evitar en la medida de lo posible el

establecimiento de otras no deseadas (e.g. especies invasoras). Con la información recogida se puede describir y analizar la distribución y diversidad de especies y comunidades (Bohmann et al., 2014) o identificar organismos que estén o hayan estado de tránsito y que pasen desapercibidos con las técnicas de muestreo tradicionales (Lear et al., 2018). Más recientemente, las técnicas de eDNA se están utilizando para la identificación y el análisis de la dispersión de especies difíciles de identificar (Thomsen et al., 2012), especialmente en algunas etapas de su ciclo vital (Gentile Francesco Ficetola, Miaud, Pompanon, & Taberlet, 2008).

A continuación, se desarrollan las aplicaciones del eDNA con mayor impacto en el campo de las Ciencias Ambientales, destacando en cada caso el nombre de las asignaturas del grado que guardan relación con esta técnica (*Figura 4*).



*Figura 4.* Aplicaciones del eDNA. Figura modificada a partir de Ruppert et al., (2019)

#### 4.3.1. Ecosistemas antiguos

- Asignaturas de alcance del eDNA: Biogeografía y biodiversidad, Ecología, Biología y Cambio Climático.

Conocer cómo fueron los ecosistemas en tiempos pasados y compararlos los actuales resulta de utilidad para la gestión y conservación de la biodiversidad. Estas aplicaciones cobran especial interés en el marco de un mundo afectado por el cambio global y la amenaza de introducción de especies invasoras (Ruppert et al., 2019). Encontramos

ejemplos de estudios en ecosistemas antiguos tanto de fauna (Olajos et al., 2018), como de flora (Pedersen et al., 2013). En este último se analizó ADN sedimentario antiguo de un lago para reconstruir la historia florística local entorno al mismo. Gentile Francesco Ficetola y colaboradores estudiaron el impacto de una especie invasora animal (el conejo europeo) sobre las comunidades de plantas en las Islas Kerguelen (un remoto archipiélago subantártico) (Gentile Francesco Ficetola et al., 2018). El eDNA también es útil para el análisis de la evolución en el tiempo de la dinámica ecológica en poblaciones, comunidades o ecosistemas (Bálint et al., 2018). En general, se recomienda la combinación de técnicas de *metabarcoding* junto a las de eDNA para minimizar errores asociados a ambas metodologías en el estudio y reconstrucciones de ecosistemas antiguos (Jørgensen et al., 2012), puesto que el tiempo y las diferencias climáticas provocan un aumento en la degradación del ADN. Boessenkool y colaboradores, identificaron especies en zonas tropicales utilizando eDNA y compararon estos resultados con los obtenidos mediante muestreos de polen. Los autores concluyeron que la resolución taxonómica era mayor con eDNA que con el muestreo de polen, a pesar de que se identificaban más especies con este último debido a que el polen puede ser transportado por el aire y sedimentar en lugares donde no se haya muestreado (Boessenkool et al., 2014).

#### 4.3.2. Interacción planta – polinizador

- Asignaturas de alcance del eDNA: Botánica, Ecología, Microbiología y Biología.

Las especies polinizadoras son esenciales para la continuidad de la vida humana y su diversidad se está viendo reducida notablemente en las últimas décadas (Ruppert et al., 2019). La aplicación de eDNA al estudio de las interacciones planta-polinizador ha contribuido a la conservación de ambos mutualistas, siendo el estudio del polen transportado por los polinizadores mediante eDNA la mayor contribución a esta aplicación. Las metodologías anteriores requieren de grandes inversiones de tiempo y esfuerzo debido a que se basaban en observaciones directas en el campo, además de requerir una gran formación y experiencia en identificación taxonómica de plantas a través del polen recolectado (Ruppert et al., 2019).

Un estudio comparativo entre los métodos tradicionales y el eDNA *metabarcoding* concluyó que la aplicación del eDNA para los taxones más abundantes no suponía una

gran ventaja, puesto que la coincidencia en los resultados entre ambos métodos era del 92% (Hawkins et al., 2015). La verdadera contribución del eDNA se observó al considerar los taxones con menor representación relativa, puesto que la coincidencia entre ambos métodos se redujo por debajo del 50%, encontrando en ambos especies que el otro método omitía.

El eDNA también se ha aplicado para estudiar el efecto que produce la introducción de especies exóticas. Por ejemplo, De Vere y colaboradores estudiaron las interacciones de las abejas (*Apis mellifera*) con las diferentes plantas de un jardín botánico y concluyeron que las especies polinizadoras tenían preferencia por las especies autóctonas o nativas, reforzando la necesidad de proteger estos lugares (De Vere et al., 2017). Otra aplicación del eDNA en el estudio de la interacción planta-polinizador se encuentra en el estudio de patrones de flujo génico en un marco geográfico amplio (Chang et al., 2018). Utilizando eDNA, Suchan, Talavera, Sáez, Ronikier y Vila, (2019) identificaron y estimaron el flujo génico entre poblaciones de plantas de ambas costas del Mediterráneo mediado por el lepidóptero *Vanessa cardui*.

#### 4.3.3. Análisis de la dieta

- Asignaturas de alcance del eDNA: Zoología, Ecología y Biología.

Las técnicas tradicionales para el análisis de la dieta basan la identificación de especies utilizando material alimenticio parcial o totalmente digerido. Estas metodologías son especialmente complicadas en el estudio de dieta de especies raras, acuáticas, nocturnas, etc. debido a la dificultad de encontrar muestras de estas especies (Boyer, Wratten, Holyoake, Abdelkrim, & Cruickshank, 2013). Asimismo, la degradación parcial o total de los restos biológicos digeridos causa que la identificación de los mismos requiera de especialistas o, sencillamente, sea imposible. La aplicación del *metabarcoding* al análisis de dieta se ha postulado como una técnica más fiable debido a la resolución taxonómica que se consigue a partir del material biológico obtenido en los restos de dietas (Guillerault, Bouletreau, Iribar, Valentini, & Santoul, 2017). Esta afirmación es más relevante aún en el estudio de herbívoros y depredadores donde la adición de un cebador especial de bloqueo a la PCR reduce la amplificación de ADN no diana (McInnes et al., 2017). El eDNA permite, además, identificar especies incluso sin necesidad de encontrar trazas de material genético de estas sino, por ejemplo,

identificando parásitos de las especies depredadas en la muestra (Jakubavičiute, Bergström, Eklöf, Haenel, & Bourlat, 2017).

El eDNA no solo se ha utilizado para la caracterización de la dieta sino también para estudios relacionados con la ecología de la alimentación (Shehzad et al., 2012) y el control de la alimentación suplementaria (Kowalczyk et al., 2011). Además, la aplicación de técnicas de eDNA han mostrado su eficacia en el análisis de la capacidad de carga de un ecosistema. Por ejemplo, Jakubavičiute et al., (2017), utilizando técnicas de eDNA, concluyeron con que el aumento en el número de individuos de una especie en un ecosistema determinado agotaba los recursos alimenticios y tenía consecuencias negativas para el equilibrio ecosistémico.

Si bien el eDNA se postula como una de las técnicas más precisas para el estudio de los hábitos alimenticios de las especies (Buglione et al., 2018), aún se describen especies cuya identificación mediante técnicas moleculares es más imprecisa que mediante el uso de técnicas tradicionales. Para obtener una mejora en los resultados es conveniente el uso complementario del *metabarcoding* de ADN con las técnicas tradicionales. Por ejemplo, Guillerault et al., (2017) estudiaron la dieta de una especie invasora (Siluro europeo, *Silurus glanis*) y concluyeron que su dieta estaba compuesta por 14 especies diferentes: con el eDNA se identificaron 11 de las 14 especies mientras que mediante el análisis estomacal solo se identificaron cinco, tres de las cuales no pudieron ser identificadas por eDNA.

#### 4.3.4. Detección de especies invasoras

- Asignaturas de alcance del eDNA: Zoología, Biología, Ecología, Biogeografía y Biodiversidad

Las especies invasoras son aquellas que se encuentran fuera de su área de distribución natural y que pueden causar alteraciones en los ecosistemas. Se consideran, además, “exóticas” si han sido introducidas por el ser humano y suponen una de las mayores amenazas para los ecosistemas y biodiversidad (Ruppert et al., 2019). Por ejemplo, las aguas de arrastre transportadas por grandes buques (Gerhard & Gunsch, 2019) fuerzan el movimiento de especies a regiones donde no se encontraban de forma natural, causando alteraciones de las interacciones ecológicas (especies acuáticas invasoras). Ardura y colaboradores realizaron un muestreo en barco desde el Mar del Norte hasta



los trópicos y analizaron las aguas de lastre en su viaje descubriendo que sí se transportaban especies que se consideran invasivas en sus áreas de introducción (Ardura et al., 2015). Ese mismo año, se publicaron dos artículos donde se comparaban las técnicas tradicionales (monitoreo de rutina y análisis morfológicos visuales) con el eDNA *metabarcoding*, este último consiguió identificar un mayor número de especies (Zaiko, Martinez, et al., 2015; Zaiko, Samuiloviene, Ardura, & Garcia-Vazquez, 2015).

Uno de los mayores problemas para la erradicación de estas especies acuáticas invasoras es la dificultad para identificarlas en estados larvarios y juvenil, por lo que pasan desapercibidas en las primeras fases de invasión y dificultan enormemente su erradicación cuando existen adultos reproductores (Pochon, Bott, Smith, & Wood, 2013). El eDNA ofrece una detección temprana, permite identificar ADN aun estando en un porcentaje inferior al 0.5% del total de la muestra (Pochon et al., 2013), tiene la capacidad de detectar taxones diferentes simultáneamente y se puede utilizar tanto en aguas dulces como en aguas saladas. Pese a esto, se recomienda precaución a la hora de interpretar los resultados y especialmente al cuantificar la biodiversidad utilizando información de presencia/ausencia de las especies (Hatzenbuehler, Kelly, Martinson, Okum, & Pilgrim, 2017; Pochon et al., 2013). En la identificación de especies invasoras mediante eDNA son frecuentes los falsos positivos y negativos debido a la presencia de material genético de individuos muertos o errores en la resolución taxonómica (relacionados con la especificidad de los cebadores) entre otros (Fletcher et al., 2017). Los errores en la identificación de especies pueden tener consecuencias negativas tanto en la inversión económica (dinero mal invertido) como en la gestión de los ecosistemas (falsos negativos de especies invasoras suelen finalizar con una invasión que se podría haber evitado) (Darling & Mahon, 2011; Gentile F. Ficetola et al., 2015).

#### 4.3.5 Respuesta a la contaminación

- Asignaturas de alcance del eDNA: Microbiología, Ecología, Biogeografía y Biodiversidad.

El eDNA en estas áreas de las Ciencias Ambientales se utiliza principalmente para el estudio de las respuestas del medio ambiente ante los cambios provocados por la contaminación. Se usa, además, para averiguar las probabilidades de una especie de sobrevivir o no a un contaminante y así obtener información sobre la gravedad del mismo (Ruppert et al., 2019). Un claro ejemplo del efecto de los contaminantes sobre

los ecosistemas y la biodiversidad es el efecto de las prospecciones petroleras sobre los ecosistemas marinos. Gracias a los estudios que utilizan eDNA se ha concluido que los metazoos son los más afectados por la contaminación derivada de la actividad petrolífera, hallándose cambios en las estructuras de las comunidades existentes en el sedimento que rodea la plataforma, que incluían metazoos así como algunos taxones protistas (Lanzén, Lekang, Jonassen, Thompson, & Troedsson, 2016).

Se ha observado, además, que existen bacterias que pueden utilizarse como bioindicadores, al sobrevivir en áreas expuestas a los hidrocarburos (que explotan como recurso trófico). La identificación de estas bacterias mediante eDNA permite categorizar el grado de contaminación de un área determinada (Laroche et al., 2018). Del mismo modo Bell et al., (2014) estudiaron las comunidades fúngicas y bacterianas de suelo de la rizosferas de sauces (*Salix* spp.) y del suelo de una antigua planta petroquímica, obteniendo como resultado cambios drásticos en las comunidades fúngicas y una disminución de la diversidad bacteriana. Los residuos nucleares también son susceptibles de ser identificados e incluso cuantificados mediante eDNA. Así por ejemplo, Smith et al., (2015) utilizaron las comunidades microbianas para cuantificar el grado de contaminación por residuos nucleares, y concluyeron, que estas comunidades microbianas pueden ser usadas como marcadores ambientales para evaluar el impacto de los residuos nucleares.

Otro ejemplo de la aplicación del eDNA para la evaluación del impacto ambiental causado por las actividades humanas es su aplicación para el estudio de las zonas aledañas a las piscifactorías. Pawlowski y colaboradores demostraron que los foraminíferos son un sistema de estudio óptimo para determinar el impacto de la acuicultura y otras actividades en el medio marino (Pawlowski, Esling, Lejzerowicz, Cedhagen, & Wilding, 2014). Entre otras conclusiones de su trabajo, mostraron que la riqueza específica disminuía cuanto más cerca de la piscifactoría se estimara dicho índice. Las comunidades bacterianas pueden ser también buenas indicadoras del impacto producido por las piscifactorías, debido a que la composición bacteriana está muy relacionada con al enriquecimiento orgánico de la zona (Dowle, Pochon, Keeley, & Wood, 2015).

Los metales pesados destacan entre los contaminantes más agresivos y con mayor impacto ambiental. La microbiota del suelo es fundamental para su productividad y los

efectos de la contaminación son determinantes para la estructura de estas comunidades. Azarbad y colaboradores estudiaron los efectos del zinc y plomo sobre la microbiota en un suelo contaminado y concluyeron que estos metales pesados afectaban a la estructura, pero no a la variabilidad taxonómica o la composición de la comunidad (Azarbad et al., 2015). El mercurio es otro de los metales más contaminantes en los suelos. Sus efectos sobre la biodiversidad se han demostrado tanto en medios terrestres (Durand et al., 2017) como marinos (Frontalini et al., 2018), en estudios centrados en las comunidades de hongos y foraminíferos bentónicos (respectivamente).

#### 4.3.6. Análisis de la calidad del aire

- Asignaturas de alcance del eDNA: Microbiología, Biología y Ecología.

La contribución del eDNA en el campo de la Biomedicina ha sido especialmente notoria, puesto que las técnicas tradicionales son demasiado laboriosas y poco eficaces (Kraaijeveld et al., 2015). El análisis del aire se realiza tanto en ambientes naturales como en ambientes cerrados (e.g. hospitales) (Tong et al., 2017) y suele centrarse en la caracterización del microbioma, comunidades fúngicas y/o polen en suspensión. El estudio del microbioma existente en el aire permite evaluar sus posibles efectos sobre la salud humana y el medio ambiente. Relacionado con el ámbito de la salud pública está el estudio de la diversidad taxonómica de las comunidades fúngicas en el aire por sus efectos tóxicos y/o alergénicos (Banchi et al., 2018). Los estudios anteriores al eDNA se centraban en las propiedades físicas y químicas y la mayoría de los datos existentes sobre las comunidades microbianas en el aire son a nivel familiar o de género y no dan información sobre sus potenciales alérgenos y patógenos, por contrario, con el eDNA llega a nivel especie y por consiguiente si proporciona dicha información (Cao et al., 2014), analizaron el aire de Pekín durante un evento de smog fotoquímico e identificaron la mayoría de los taxones llegando a nivel de especie y detectaron alérgenos y otros patógenos microbianos respiratorios.

El eDNA *metabarcoding* ha demostrado ser una herramienta útil a la hora de identificar polen en el aire de muestras ambientales, por eso, Leontidou et al., (2018) propusieron un protocolo de preparación de muestras y extracción de ADN para el polen de muestreos de aire. Los autores concluyeron que el eDNA *metabarcoding* tiene una mayor resolución taxonómica incluso en muestras complejas.

#### 4.3.7. Inconvenientes comunes para las aplicaciones:

El análisis conjunto del impacto del eDNA sobre las disciplinas de las Ciencias Ambientales descritas en este TFG permite extraer algunas conclusiones transversales a todas ellas. Por un lado, si bien se observa una mayor resolución taxonómica con respecto a las técnicas tradicionales (Banchi et al., 2018; Boessenkool et al., 2014) se recomienda que se usen conjuntamente debido al sesgo en la identificación inherente a cada técnica (Jørgensen et al., 2012; Richardson, Lin, Sponsler, et al., 2015; Richardson, Lin, Quijia, et al., 2015). En general, este sesgo suele deberse a que el eDNA identifica peor las moléculas encontradas en menor proporción debido al sesgo en la amplificación y secuenciación de ADN, problema que se está logrando solventar (Pochon et al., 2013). A modo de resumen, se puede afirmar que las aplicaciones del eDNA suelen verse limitadas por la propia generación de las bibliotecas genéticas, las tasas de degradación del ADN dependiendo de la especie y el sustrato muestreado y la contaminación de las muestras (Bellemain et al., 2013; Boessenkool et al., 2012; Pedersen et al., 2013; Ruppert et al., 2019) (Ver apartado 4.1 “Técnica y aspectos metodológicos”).

### **5. BIBLIOMETRÍA:**

El análisis del impacto del eDNA en materias relacionadas con las Ciencias Ambientales se realizó mediante un análisis bibliométrico de publicaciones en la base de datos *Web Of Science* (WoS) ([www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com)) utilizando las siguientes palabras clave:

*TEMA: ("environmental DNA") OR TEMA: (eDNA) Refinado por: DOMINIOS DE INVESTIGACIÓN: ( SCIENCE TECHNOLOGY ) Período de tiempo: 1980-2019. Bases de datos: WOS, CCC, DIIDW, KJD, MEDLINE, RSCI, SCIELO, ZOOREC. Idioma de búsqueda=Auto*

Dado que el número de publicaciones anteriores al año 1980 suponen un escaso 1.1% y que estas publicaciones no tienen una relación real con la técnica, se restringió la búsqueda al periodo de tiempo comprendido desde 1980 hasta la actualidad. Con estas palabras clave se obtuvieron 2867 publicaciones sin filtrar por el área de conocimiento (*Figura 5*). La extensión y aplicación del eDNA en el dominio de Ciencia y Tecnología queda constatado al observarse un importante crecimiento a lo largo de esta última

década, llegando a cuantificarse en un 308.9% el incremento del número de publicaciones en el periodo de 2014 a 2018.



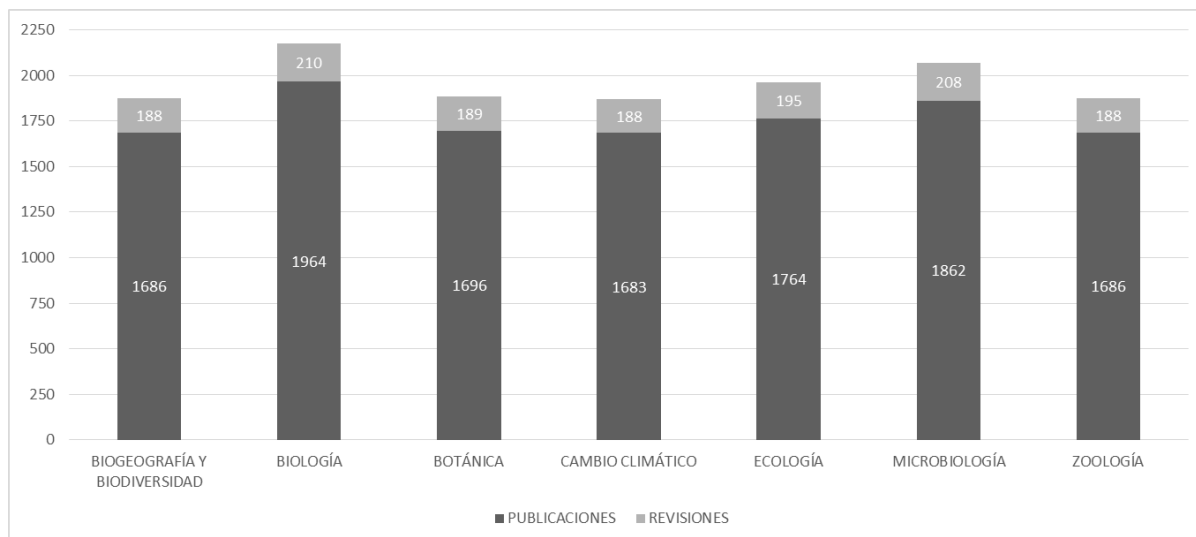
Figura 5. Publicaciones de eDNA por años.

Para evaluar el uso del eDNA en las distintas áreas de conocimiento (criterio de búsqueda en WoS: “tema”) se realizó mediante búsquedas restringidas a las mismas en WoS utilizando las siguientes palabras clave:

*(TEMA: ("environmental DNA") OR ((TEMA: (eDNA) AND TEMA: (XXXX))) Refinado por: DOMINIOS DE INVESTIGACIÓN: ( SCIENCE TECHNOLOGY ) Período de tiempo: 1980-2019. Bases de datos: WOS, CCC, DIIDW, KJD, MEDLINE, RSCI, SCIELO, ZOOREC. Idioma de búsqueda=Auto*

Las áreas de conocimiento estudiadas son: Biogeografía y Biodiversidad, Biología, Botánica, Cambio Climático, Ecología, Microbiología y Zoología. Se han seleccionado dichas áreas ya que son disciplinas basadas en las ciencias experimentales y, como tal se basan en datos recogidos de muestreos. Dado que en todas ellas se han descrito sesgos debido a errores de muestreo, es lógico, que sean también aquellas disciplinas que más hayan tratado de adaptar el eDNA a sus intereses.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6. El eDNA se ha utilizado de manera similar en las seis áreas de conocimiento ( $1958.14 \pm 119.87$ ) (media  $\pm$  desviación estándar), si bien destacan levemente las áreas de Biología (n= 2174) y Microbiología (n= 2070).



*Figura 6.* Número de publicaciones y revisiones por área de conocimiento indexadas en WoS desde 1980.

## 6. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Con los avances ya implementados se puede obtener el genoma, los trabajos ahora se dirigen a reducir las tasas de error de secuenciación, mejorar las técnicas bioinformáticas que permitan ensamblar las secuencias obtenidas y en las mejoras tecnológicas. En relación a esto último, las investigaciones se dirigen hacia la reducción en cuanto al tamaño de los instrumentos. Ya existen algunos de estos instrumentos como el “Biomeme two3” de la empresa “Biomeme, Inc.”, un dispositivo para PCR de mano con la capacidad de detectar hasta tres taxones diferentes (Coble et al., 2019) o secuenciadores masivos como los desarrollados por la empresa británica “Oxford Nanopore” que ya ha comercializado el “MinION” (*Figura 7*), un secuenciador masivo del tamaño de una memoria USB.



*Figura 7.* “MinION” de Oxford Nanopore. (Imágenes extraídas de nanoporetech.com)

La importancia de reducir el tamaño hasta poder utilizarlo como material portátil, que puedan detectar, amplificar e incluso secuenciar ADN, resulta útil sobre todo en

entornos aislados (Russell et al., 2018). Otra posibilidad de futuro, a raíz de la reducción en el tamaño de los dispositivos, sería la opción de realizar muestreos de eDNA de forma automática (como las boyas de muestreo de derrames de petróleo), combinado con la tecnología para transmitir datos en vivo (enviando la información de manera remota a dispositivos inteligentes) y el proyecto de mapeo en 3D de la superficie de la Tierra. Esto, llevado a gran escala, permitiría realizar muestreos remotos a lugares inaccesible, como el Ártico o las profundidades de los océanos, ya que solo habría que hacer llegar el dispositivo (Bohmann et al., 2014).

## **7. CONCLUSIONES**

- 1) El eDNA utiliza metodologías similares a las técnicas de *metabarcoding* para identificar simultáneamente varios taxones partiendo de una sola muestra.
- 2) El desarrollo tecnológico y reducción de costes de los secuenciadores masivos está estrechamente ligado a éxito del eDNA.
- 3) Una de las ventajas principales del ADN ambiental es la facilidad del muestreo, puesto que no es necesario capturar a los individuos sino tomar una muestra del sustrato por donde estos pasaron (tierra/agua/aire).
- 4) El eDNA identifica un mayor número de taxones que los métodos tradicionales, aunque aún se recomienda utilizar ambas técnicas para reducir los errores de muestreo (falsos positivos/negativos).
- 5) El eDNA se incluye hoy día como técnica de rutina en todas las áreas de conocimiento de las Ciencias de la Vida y se prevee que su auge se mantenga en los próximos años.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

- Ardura, A., Zaiko, A., Martinez, J. L., Samuiloviene, A., Borrell, Y., & Garcia-Vazquez, E. (2015). Environmental DNA evidence of transfer of North Sea molluscs across tropical waters through ballast water. *Journal of Molluscan Studies*, 81(4), 495–501.
- Azarbad, H., Niklińska, M., Laskowski, R., van Straalen, N. M., van Gestel, C. A. M., Zhou, J., ... Röling, W. F. M. (2015). Microbial community composition and

- functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(1).
- Bálint, M., Pfenninger, M., Grossart, H. P., Taberlet, P., Vellend, M., Leibold, M. A., ... Bowler, D. (2018, December 1). Environmental DNA Time Series in Ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, Vol. 33, pp. 945–957.
- Banchi, E., Ametrano, C. G., Stanković, D., Verardo, P., Moretti, O., Gabrielli, F., ... Muggia, L. (2018). DNA metabarcoding uncovers fungal diversity of mixed airborne samples in Italy. *PLoS ONE*, 13(3).
- Bell, T. H., El-Din Hassan, S., Lauron-Moreau, A., Al-Otaibi, F., Hijri, M., Yergeau, E., & St-Arnaud, M. (2014). Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. *ISME Journal*, 8(2), 331–343.
- Bellemain, E., Davey, M. L., Kauserud, H., Epp, L. S., Boessenkool, S., Coissac, E., ... Brochmann, C. (2013). Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic permafrost. *Environmental Microbiology*, 15(4), 1176–1189.
- Boessenkool, S., Epp, L. S., Haile, J., Bellemain, E., Edwards, M., Coissac, E., ... Brochmann, C. (2012). Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1806–1815.
- Boessenkool, S., McGlynn, G., Epp, L. S., Taylor, D., Pimentel, M., Gizaw, A., ... Popp, M. (2014). Use of ancient sedimentary DNA as a novel conservation tool for high-altitude tropical biodiversity. *Conservation Biology*, 28(2), 446–455.
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., ... de Bruyn, M. (2014, June 1). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, Vol. 29, pp. 358–367.
- Boyer, S., Wratten, S. D., Holyoake, A., Abdelkrim, J., & Cruickshank, R. H. (2013). Using Next-Generation Sequencing to Analyse the Diet of a Highly Endangered Land Snail (*Powelliphanta augusta*) Feeding on Endemic Earthworms. *PLoS ONE*, 8(9).



- Buglione, M., Maselli, V., Rippa, D., de Filippo, G., Trapanese, M., & Fulgione, D. (2018). A pilot study on the application of DNA metabarcoding for non-invasive diet analysis in the Italian hare. *Mammalian Biology*, 88, 31–42.
- Camacho-Sanchez, M., Burraco, P., Gomez-Mestre, I., & Leonard, J. A. (2013). Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 663–673.
- Cao, C., Jiang, W., Wang, B., Fang, J., Lang, J., Tian, G., ... Zhu, T. F. (2014). Inhalable microorganisms in Beijing's PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> pollutants during a severe smog event. *Environmental Science and Technology*, 48(3), 1499–1507.
- Chang, H., Guo, J., Fu, X., Liu, Y., Wyckhuys, K. A. G., Hou, Y., & Wu, K. (2018). Molecular-assisted pollen grain analysis reveals spatiotemporal origin of long-distance migrants of a noctuid moth. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2).
- Coble, A. A., Flinders, C. A., Homyack, J. A., Penaluna, B. E., Cronn, R. C., & Weitemier, K. (2019). eDNA as a tool for identifying freshwater species in sustainable forestry: A critical review and potential future applications. *Science of The Total Environment*, 649, 1157–1170.
- Darling, J. A., & Mahon, A. R. (2011). From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research*, 111(7), 978–988.
- De Vere, N., Jones, L. E., Gilmore, T., Moscrop, J., Lowe, A., Smith, D., ... Ford, C. R. (2017). Using DNA metabarcoding to investigate honey bee foraging reveals limited flower use despite high floral availability. *Scientific Reports*, 7.
- Dowle, E., Pochon, X., Keeley, N., & Wood, S. A. (2015). Assessing the effects of salmon farming seabed enrichment using bacterial community diversity and high-throughput sequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(8).
- Drummond, A. J., Newcomb, R. D., Buckley, T. R., Xie, D., Dopheide, A., Potter, B. C., ... Nelson, N. (2015). Evaluating a multigene environmental DNA approach for biodiversity assessment. *GigaScience*, 4(1), 46.

- Durand, A., Maillard, F., Foulon, J., Gweon, H. S., Valot, B., & Chalot, M. (2017). Environmental Metabarcoding Reveals Contrasting Belowground and Aboveground Fungal Communities from Poplar at a Hg Phytomanagement Site. *Microbial Ecology*, 74(4), 795–809.
- Epp, L. S., Boessenkool, S., Bellemain, E. P., Haile, J., Esposito, A., Riaz, T., ... Brochmann, C. (2012). New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: Potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology*, 21(8), 1821–1833.
- Ficetola, Gentile F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguet-Covex, C., De Barba, M., ... Taberlet, P. (2015). Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 543–556.
- Ficetola, Gentile Francesco, Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423–425.
- Ficetola, Gentile Francesco, Poulenard, J., Sabatier, P., Messenger, E., Gielly, L., Leloup, A., ... Arnaud, F. (2018). DNA from lake sediments reveals long-term ecosystem changes after a biological invasion. *Science Advances*, 4(5).
- Fletcher, L. M., Zaiko, A., Atalah, J., Richter, I., Dufour, C. M., Pochon, X., ... Hopkins, G. A. (2017). Bilge water as a vector for the spread of marine pests: a morphological, metabarcoding and experimental assessment. *Biological Invasions*, 19(10), 2851–2867.
- Frontalini, F., Greco, M., Di Bella, L., Lejzerowicz, F., Reo, E., Caruso, A., ... Pawlowski, J. (2018). Assessing the effect of mercury pollution on cultured benthic foraminifera community using morphological and eDNA metabarcoding approaches. *Marine Pollution Bulletin*, 129(2), 512–524.
- Gerhard, W. A., & Gunsch, C. K. (2019). *Metabarcoding and machine learning analysis of environmental DNA in ballast water arriving to hub ports*.
- Guillerault, N., Bouletreau, S., Iribar, A., Valentini, A., & Santoul, F. (2017). Application of DNA metabarcoding on faeces to identify European catfish *Silurus*

- glanis diet. *Journal of Fish Biology*, 90(5), 2214–2219.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 68(4), 669–685.
- Hartb, M. M., Bainarda, L. D., & Klironomosb, J. N. (2010). Differential effect of sample preservation methods on plant and arbuscular mycorrhizal fungal DNA. *Journal of Microbiological Methods*, Volume 82,.
- Hatzenbuhler, C., Kelly, J. R., Martinson, J., Okum, S., & Pilgrim, E. (2017). Sensitivity and accuracy of high-throughput metabarcoding methods for early detection of invasive fish species. *Scientific Reports*, 7.
- Hawkins, J., De Vere, N., Griffith, A., Ford, C. R., Allainguillaume, J., Hegarty, M. J., ... Adams-Groom, B. (2015). Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences. *PLoS ONE*, 10(8).
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321.
- Henry, P., & Russello, M. A. (2011). Obtaining high-quality DNA from elusive small mammals using low-tech hair snares. *European Journal of Wildlife Research*, 57(3), 429–435.
- Jakubavičiute, E., Bergström, U., Eklöf, J. S., Haenel, Q., & Bourlat, S. J. (2017). DNA metabarcoding reveals diverse diet of the three-spined stickleback in a coastal ecosystem. *PLoS ONE*, 12(10)
- Jørgensen, T., Kjær, K. H., Haile, J., Rasmussen, M., Boessenkool, S., Andersen, K., ... Willerslev, E. (2012). Islands in the ice: Detecting past vegetation on Greenlandic nunataks using historical records and sedimentary ancient DNA Meta-barcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 1980–1988.
- Kowalczyk, R., Taberlet, P., Coissac, E., Valentini, A., Miquel, C., Kamiński, T., & Wójcik, J. M. (2011). Influence of management practices on large herbivore diet-

- Case of European bison in Białowieża Primeval Forest (Poland). *Forest Ecology and Management*, 261(4), 821–828.
- Kraaijeveld, K., de Weger, L. A., Ventayol García, M., Buermans, H., Frank, J., Hiemstra, P. S., & den Dunnen, J. T. (2015). Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 15(1), 8–16.
- Kurose, N., Masuda, R., & Tatara, M. (2005). Fecal DNA Analysis for Identifying Species and Sex of Sympatric Carnivores: A Noninvasive Method for Conservation on the Tsushima Islands, Japan. *Journal of Heredity*, (6), 688–697.
- Lanzén, A., Lekang, K., Jonassen, I., Thompson, E. M., & Troedsson, C. (2016). High-throughput metabarcoding of eukaryotic diversity for environmental monitoring of offshore oil-drilling activities. *Molecular Ecology*, 25(17), 4392–4406.
- Laroche, O., Wood, S. A., Tremblay, L. A., Ellis, J. I., Lear, G., & Pochon, X. (2018). A cross-taxa study using environmental DNA/RNA metabarcoding to measure biological impacts of offshore oil and gas drilling and production operations. *Marine Pollution Bulletin*, 127, 97–107.
- Lauber, C. L., Zhou, N., Gordon, J. I., Knight, R., & Fierer, N. (2010). Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *FEMS Microbiology Letters*, 307(1), 80–86.
- Lear, G., Dickie, I., Banks, J., Boyer, S., Buckley, H., Buckley, T., ... Holdaway, R. (2018). Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. *New Zealand Journal of Ecology*.
- Leontidou, K., Vernesi, C., De Groeve, J., Cristofolini, F., Vokou, D., & Cristofori, A. (2018). DNA metabarcoding of airborne pollen: new protocols for improved taxonomic identification of environmental samples. *Aerobiologia*, 34(1), 63–74.
- McInnes, J. C., Alderman, R., Deagle, B. E., Lea, M. A., Raymond, B., & Jarman, S. N. (2017). Optimised scat collection protocols for dietary DNA metabarcoding in vertebrates. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(2), 192–202.
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA barcoding: Error rates based on

- comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3(12), 1–10.
- Nathan, R., Getz, W. M., Revilla, E., Holyoak, M., Kadmon, R., Saltz, D., & Smouse, P. E. (2008, December 9). A movement ecology paradigm for unifying organismal movement research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 105, pp. 19052–19059.
- Nsubuga, A. M., Robbins, M. M., Roeder, A. D., Morin, P. A., Boesch, C., & Vigilant, L. (2004). Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Molecular Ecology*, 13(7), 2089–2094.
- Olajos, F., Bokma, F., Bartels, P., Myrstener, E., Rydberg, J., Öhlund, G., ... Englund, G. (2018). Estimating species colonization dates using DNA in lake sediment. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(3), 535–543.
- Pawlowski, J., Esling, P., Lejzerowicz, F., Cedhagen, T., & Wilding, T. A. (2014). Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: Assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities. *Molecular Ecology Resources*, 14(6), 1129–1140.
- Pedersen, M. W., Ginolhac, A., Orlando, L., Olsen, J., Andersen, K., Holm, J., ... Kjær, K. H. (2013). A comparative study of ancient environmental DNA to pollen and macrofossils from lake sediments reveals taxonomic overlap and additional plant taxa. *Quaternary Science Reviews*, 75, 161–168.
- Piaggio, A. J., Engeman, R. M., Hopken, M. W., Humphrey, J. S., Keacher, K. L., Bruce, W. E., & Avery, M. L. (2014). Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 14(2), 374–380.
- Pochon, X., Bott, N. J., Smith, K. F., & Wood, S. A. (2013). Evaluating Detection Limits of Next-Generation Sequencing for the Surveillance and Monitoring of International Marine Pests. *PLoS ONE*, 8(9).
- Qu, C., & Stewart, K. A. (2019). Evaluating monitoring options for conservation: comparing traditional and environmental DNA tools for a critically endangered

- mammal. *Science of Nature*, 106(3–4), 9.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364.
- Richardson, R. T., Lin, C.-H., Sponsler, D. B., Quijia, J. O., Goodell, K., & Johnson, R. M. (2015). Application of ITS2 Metabarcoding to Determine the Provenance of Pollen Collected by Honey Bees in an Agroecosystem. *Applications in Plant Sciences*, 3(1), 1400066.
- Richardson, R. T., Lin, C., Quijia, J. O., Riusech, N. S., Goodell, K., & Johnson, R. M. (2015). Rank-based characterization of pollen assemblages collected by honey bees using a multi-locus metabarcoding approach. *Applications in Plant Sciences*, 3(11), 1500043.
- Rondon, M. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., ... Goodman, R. M. (2000). Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2541–2547.
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019, January 1). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, Vol. 17, p. e00547.
- Russell, J. A., Campos, B., Stone, J., Blosser, E. M., Burkett-Cadena, N., & Jacobs, J. L. (2018). Unbiased Strain-Typing of Arbovirus Directly from Mosquitoes Using Nanopore Sequencing: A Field-forward Biosurveillance Protocol. *Scientific Reports*, 8(1).
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174)* (Vol. 74).
- Shehzad, W., McCarthy, T. M., Pompanon, F., Purevjav, L., Coissac, E., Riaz, T., & Taberlet, P. (2012). Prey preference of snow leopard (*panthera uncia*) in south gobi, mongolia. *PLoS ONE*, 7(2).

- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, Vol. 21, pp. 1794–1805.
- Smith, M. B., Rocha, A. M., Smillie, C. S., Olesen, S. W., Paradis, C., Wu, L., ... Hazen, T. C. (2015). Natural bacterial communities serve as quantitative geochemical biosensors. *MBio*, 6(3), 1–13.
- Spens, J., Evans, A. R., Halfmaerten, D., Knudsen, S. W., Sengupta, M. E., Mak, S. S. T., ... Hellström, M. (2017). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635–645.
- Straube, D., & Juen, A. (2013). Storage and shipping of tissue samples for DNA analyses: A case study on earthworms. *European Journal of Soil Biology*, 57, 13–18.
- Suchan, T., Talavera, G., Sáez, L., Ronikier, M., & Vila, R. (2019). Pollen metabarcoding as a tool for tracking long-distance insect migrations. *Molecular Ecology Resources*, 19(1), 149–162.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789–1793.
- Taberlet, P., & Luikart, G. (1999). Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68(1–2), 41–55.
- Theuerkauf, J., Rouys, S., & Chatreau, C. (2007). Mortality of radio-tracked wild rats in relation to transmitter weight and resilience of transmitters in relation to their design. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 37(3), 85–90.
- Thomsen, P. F., Elias, S., Gilbert, M. T. P., Haile, J., Munch, K., Kuzmina, S., ... Willerslev, E. (2009). Non-destructive sampling of ancient insect DNA. *PLoS ONE*, 4(4).
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., ... Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(11), 2565–2573.

- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015, March 1). Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, Vol. 183, pp. 4–18.
- Tong, X., Xu, H., Zou, L., Cai, M., Xu, X., Zhao, Z., ... Li, Y. (2017). High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing-based microbiome analysis. *Scientific Reports*, 7.
- Valiere, N., & Taberlet, P. (2000). Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology*, 9(12), 2150–2152.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., ... Zhu, X. (2001). *The Sequence of the Human Genome Downloaded from* (Vol. 291).
- Wegleitner, B. J., Jerde, C. L., Tucker, A., Chadderton, W. L., & Mahon, A. R. (2015). Long duration, room temperature preservation of filtered eDNA samples. *Conservation Genetics Resources*, 7(4), 789–791.
- Wittwer, C., Nowak, C., Strand, D. A., Vrålstad, T., Thines, M., & Stoll, S. (2018). Comparison of two water sampling approaches for eDNA-based crayfish plague detection. *Limnologia*, 70, 1–9.
- Yoccoz, N. G., Bråthen, K. A., Gielly, L., Haile, J., Edwards, M. E., Goslar, T., ... Taberlet, P. (2012). DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity. *Molecular Ecology*, 21(15), 3647–3655.
- Zaiko, A., Martinez, J. L., Schmidt-Petersen, J., Ribicic, D., Samuiloviene, A., & Garcia-Vazquez, E. (2015). Metabarcoding approach for the ballast water surveillance - An advantageous solution or an awkward challenge? *Marine Pollution Bulletin*, 92(1–2), 25–34.
- Zaiko, A., Samuiloviene, A., Ardura, A., & Garcia-Vazquez, E. (2015). Metabarcoding approach for nonindigenous species surveillance in marine coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), 53–59.



## **ANEXO 1:**

### **Plataformas de secuenciación masiva**

#### ➤ Roche.

Roche arrancó la carrera de secuenciación masiva lanzando la primera plataforma en 2004 conocida como pirosecuenciación 454. En este tipo de secuenciación cada nucleótido incorporado por el ADN polimerasa proporciona la liberación de pirofosfato, el cual propicia una serie de reacciones que acaban produciendo luz gracias a la enzima luciferasa. Tiene la capacidad de generar 25 millones de bases en una ejecución de cuatro horas (Margulies et al., 2005).

El error más común es la inserción-delección de bases (Shokralla, Spall, Gibson, & Hajibabaei, 2012) aunque este problema se solventa mediante técnicas informáticas de filtrado de errores (Quince et al., 2009). Los errores producidos por esta plataforma no dependen de la posición en la lectura pero sí que suelen darse con mayor proporción en regiones cercanas a secuencias de homopolímeros (regiones del ADN con más de seis nucleótidos idénticos consecutivos) (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

#### ➤ Illumina.

El analizador de Illumina comienza el paso de la amplificación con una biblioteca compuesta por secuencias de ADN flanqueadas por adaptadores propios de la compañía. Esta biblioteca se lleva a cabo en la superficie de una celda de flujo y se hace con un dispositivo automatizado llamado *Cluster Station*. La celda donde se amplifican las secuencias de ADN cuenta con ocho canales, en los cuales se podría anexionar una biblioteca para cada canal, con lo cual compararíamos ocho bibliotecas de fragmentos de ADN diferentes con la muestra para obtener un mayor rango de información, o la misma para los ocho, para así obtener una mayor seguridad en los resultados (Mardis, 2008). Los errores están correlacionados con la posición en el “read”, acumulándose con mayor frecuencia al final del mismo (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

#### ➤ Solid.

El secuenciador de Solid utiliza bibliotecas similares a la de Illumina y se caracteriza por utilizar perlas magnéticas de pequeño tamaño para la amplificación de los fragmentos

utiliza la PCR. A diferencia de las dos plataformas anteriores, Solid utiliza ADN ligasa (Mardis, 2008).

Illumina y Solid destacan por secuenciar con menores tasas de error y el alto rendimiento en la secuenciación. Sus principales desventajas son la caída de la señal óptica y el desfase en lecturas cortas (Shokralla et al., 2012) y el error acumulativo en secuencias largas (XiaoGuang et al., 2010).

Independientemente de la plataforma de secuenciación escogida, el investigador obtiene una cantidad de información genética que no puede analizarse sino empleando herramientas bioinformáticas (Studt, 2003) que den solución al ya conocido “síndrome de HAOD” (*Huge Amount Of Data*) (Hadley, 2004).

A continuación se muestra una comparativa de las tres plataformas de secuenciación masiva (*Tabla A1*):

	ROCHE	ILLUMINA	SOLID
Química de la secuenciación	Pirosecuenciación 454	Secuencia basada en polimerasa por síntesis	Secuenciación basada en ligasa
Enfoque de ampliación	PCR en emulsión	Amplificación del puente	PCR en emulsión
Separación de extremo emparejado (PED)	3 kb	200-500 bp	3 kb
Mb por vuelta	100 Mb	1300 Mb	3000 Mb
Tiempo por vuelta PED	>0.5 Días	4 Días	5 Días
Longitud de lectura	250-400 bp	35, 75 y 100 bp	35 y 50 bp
Coste por vuelta	7607,81 €	8069,43 €	15730,47€
Coste por Mb	76,08 €	5,38 €	5,23€

*Tabla A1.* Comparación de sistemas de secuenciación.

## **Bibliografía anexo**

Hadley, C. (2004, March). Biologists think bigger. *EMBO Reports*, Vol. 5, pp. 236–238.

Mardis, E. R. (2008). Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9(1), 387–402.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bembien, L. A., ...

Rothberg, J. M. (2005). *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*.

Título: Aplicaciones de la técnica de ADN ambiental en Ciencias Ambientales.  
Autor: Amador Huerta Vela

Quince, C., Lanzén, A., Curtis, T. P., Davenport, R. J., Hall, N., Head, I. M., ... Sloan, W. T. (2009). Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods*, 6(9), 639–641.

Rodríguez-Santiago, B., & Armengol, L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnostico Prenatal*, 23(2), 56–66.

Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, Vol. 21, pp. 1794–1805.

Studt, T. (2003). Bioinformatics - Transforming data into models. In *R & D* (Vol. 45).

XiaoGuang, Z., LuFeng, R., YunTao, L., Meng, Z., YuDe, Y., & Jun, Y. (2010). SCIENCE CHINA The next-generation sequencing technology: A technology review and future perspective. *Sci China Life Sci*, 53(1), 44–57.